

文章编号:1673-1689(2009)02-0262-05

副溶血性弧菌的温度预测模型

王璐华, 宁喜斌

(上海水产大学食品学院, 上海 200090)

摘要: 采用预测食品微生物学的方法研究了副溶血性弧菌的生长规律, 测定了 4~40 ℃ 副溶血性弧菌的生长曲线, 并在此基础上建立了副溶血性弧菌的初级和二级预测模型。结果表明, 在 10~40 ℃, 副溶血性弧菌的生长曲线呈典型的 S 形, 适合用 Gompertz 和 logistic 模型拟合; 当温度在 4~10 ℃ 时, 适合用线性回归方程拟合。副溶血性弧菌的温度模型符合 Ratkowsky³ 式, 根据预测模型, 副溶血性弧菌的最低生长温度 T_{\min} 为 5.5 ℃, 最高生长温度 T_{\max} 为 47.3 ℃, 最适生长温度为 34.6 ℃。最后, 对模型进行了验证。

关键词: 水产品安全; 预测微生物学; 模型; 副溶血性弧菌

中图分类号: TS 201.3

文献标识码: A

Predictive Model for Effect of Temperature on the Growth of *Vibrio parahaemolyticus*

WANG Lu-hua, NING Xi-bin

(College of Food Science, Shanghai Fisheries University, Shanghai 200090, China)

Abstract: Predictive food microbiology is considered to be an effective tool for preventing the contamination of aquatic product from pathogenic microorganism. In this study, the growth characteristics and predictive model of *Vibrio parahaemolyticus* (*V. p* for short) at different temperature was studied by using the method of predictive microbiology. Growth curves were obtained at 4~40 ℃, and found that the Gompertz model fit at 10~40 ℃ with representation of experimental curves which are typical sigmoidal. The Monod function was below 10 ℃. The variations of growth rate with temperature were modeled, and predicted that: the minimum, maximum and the optimal growth temperature is 5.5 ℃, 47.3 ℃ and 34.6 ℃, respectively. The validity of the predictive model was further evaluated under controlled laboratory conditions.

Key words: aquatic product safety, predictive microbiology, model, *Vibrio parahaemolyticus*

副溶血性弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*, 简称 *V. p*), 又称嗜盐菌, 属于弧菌科, 弧菌属。目前, 副溶血性弧菌引起的食物中毒在细菌性食物中毒中

的比例较高, 其危害程度仅次于沙门氏菌、大肠杆菌、葡萄球菌和肉毒梭菌, 而在近年来沿海地区的食物中毒病例中, 该菌已成为首要病原^[1]。

收稿日期: 2008-02-28

基金项目: 上海市重点学科建设项目(T1102)。

* 通讯作者: 宁喜斌(1964-), 男, 黑龙江鹤岗人, 工学博士, 教授, 硕士生导师, 主要从事食品生物技术与食品安全等方面的研究。Email: xbning@shfu.edu.cn。

预测食品微生物学(predictive food microbiology)是食品微生物学的一个新兴分支学科,是在微生物学、数学、统计学和计算机应用学的基础上建立起来的新学科。它是依据各种食品微生物在不同加工、贮藏和流通条件下的特征信息库,通过计算机的配套软件,判断食品内主要病原菌和腐败菌生长或残存的动态变化,从而对食品的质量安全做出快速评估。因此,可以通过预测食品微生物学的方法,定量预测水产品生产加工后的贮藏、运输、销售和消费等各个环节的质量和安全性^[2]。

国内外关于副溶血性弧菌生长模型的研究比较少,在水产食品生产过程中,温度是影响微生物生长最重要的因素之一,一些温度单因素的模型也能和食品中微生物生长数据相吻合^[3-4]。因此,作者着重研究温度对副溶血性弧菌生长的影响,对4~40℃副溶血性弧菌的生长规律进行了实验研究,在此基础上建立副溶血性弧菌生长的初级和二级预测模型,为水产品的安全性评价提供理论依据。

1 材料与方 法

1.1 实验菌株

副溶血性弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*) V. pl. 2164, 购于中国科学院普通菌种保藏中心。

1.2 实验药品与设备

TCBS培养基,上海市疾病预防控制中心提供;蛋白胨,国药集团化学试剂有限公司产品;氯化钠、盐酸、氢氧化钠(分析纯),上海凌峰化学试剂有限公司产品。

不锈钢自动手提式压力蒸汽灭菌器 DSX-280B型,上海申安医疗器械厂生产;移液器 Gilson,法国产;隔水式恒温培养箱 GHP-9270、低温生化培养箱 LRH-250CL,上海一恒科学仪器有限公司制造;台式酸度计 InoLab pH 730,德国 WTW 仪器制造。

1.3 实验方法

1.3.1 菌种的活化 使用前,将副溶血性弧菌接种在3 g/dL 氯化钠蛋白胨水培养基中,30℃培养24 h,此时副溶血性弧菌处在稳定期。

1.3.2 培养基的制备

1) TCBS培养基:按照配制说明配制。

2) 3 g/dL 氯化钠蛋白胨水培养基:使用1~10 mL 移液枪,向每个15 cm×150 cm的试管中准确加入5 mL 做好的培养基,121℃灭菌20 min,冷却后放在4~8℃冰箱内备用。

3) 无菌生理盐水的制备:称取氯化钠,用蒸馏水配制成0.85 g/dL 氯化钠水溶液,分装后在121

℃灭菌20 min。

1.3.3 计数 采用平板计数法。

1.3.4 4~40℃副溶血性弧菌生长曲线测定 将3 g/dL 氯化钠蛋白胨水培养基放在同一温度的隔水式恒温培养箱中平衡一段时间。用3 g/dL 氯化钠蛋白胨水培养基对菌种进行适当稀释,制成实验菌液,细菌浓度控制在 10^4 cfu/mL左右。无菌条件下移取菌液0.5 mL到5 mL 3 g/dL 氯化钠蛋白胨水培养基中,充分混合,测定管内初始菌数。将各试管放在隔水式恒温培养箱中,每隔2 h取出一支试管,用平板计数法测定菌落数。每条生长曲线测定12个点,测定终止时,副溶血性弧菌至少繁殖1 000倍以上。

测定生长曲线时的培养温度分别为4、7、10、14、17、20、24、27、30、33、37、40℃,每个实验重复2次,数据取平均值。培养温度在20℃以上(含20℃)使用隔水式恒温培养箱,20℃以下时使用低温生化培养箱。隔水式恒温培养箱温度波动 ± 0.1 ℃,低温生化培养箱温度波动 ± 1.0 ℃。

2 结果与分析

2.1 副溶血性弧菌生长曲线模型的建立

2.1.1 一级模型的建立 用Gompertz方程, Logistic方程以及Linear方程分别对4~40℃副溶血性弧菌的生长曲线进行回归,结果见表1。对3种模型的相关系数 r 和剩余均方差(MSE)进行了比较。图1所示的是用Gompertz和Logistic方程拟合的30℃副溶血性弧菌的生长曲线。

从表1可以看出,在10~40℃时,副溶血性弧菌生长曲线都能用Logistic方程和Gompertz方程拟合,且相关系数都在0.90以上。在4~10℃时,Gompertz模型和Logistic模型不适合所有曲线,而Linear方程可以拟合所有曲线,且相关指数都在0.90以上。

总的来说,副溶血性弧菌在10~40℃范围内,对于同一条生长曲线,Gompertz模型拟合的相关系数与Logistic模型拟合的相关系数相差极小,Gompertz模型拟合的相关指数在10,14,33℃时略大,其余温度下略小,而Linear模型的相关指数是最小的;从剩余均方差来看,Logistic模型的剩余均方差与Gompertz模型的剩余均方差相差也很小,而Linear模型的剩余均方差最大。由此可见,在10~40℃时,Gompertz模型和Logistic模型对副溶血性弧菌生长曲线的拟合度都很高,而在4~10℃时,副溶血性弧菌生长缓慢或出现负增长,用

Gompertz 和 Logistic 模型无法拟合, 而 Linear 模型拟合度较高。

表 1 副溶血性弧菌生长曲线的统计分析

Tab. 1 Statistical-analytical data for growth curves of *V. p*

培养温度 $T/^\circ\text{C}$	相关系数 r			剩余均方差 MSE		
	Gomp.	Logis.	Linear	Gomp.	Logis.	Linear
4	—	—	0.9165	—	—	0.337 8
7	—	—	0.9094	—	—	0.299 8
10	0.942 0	0.941 0	0.828 5	0.159 9	0.161 2	0.434 3
14	0.937 0	0.936 7	0.935 2	0.267 8	0.268 3	0.253 9
17	0.953 4	0.954 8	0.947 7	0.407 4	0.401 4	0.406 3
20	0.951 3	0.954 2	0.947 5	0.619 8	0.602 0	0.601 8
24	0.925 3	0.934 3	0.801 1	0.712 0	0.669 1	1.071 1
27	0.990 8	0.993 3	0.725 5	0.201 3	0.171 8	0.955 4
30	0.986 8	0.989 3	0.720 8	0.236 2	0.212 8	0.946 5
33	0.963 6	0.963 0	0.646 6	0.393 9	0.397 3	1.066 6
37	0.972 6	0.980 1	0.611 5	0.451 6	0.386 1	1.437 9
40	0.993 8	0.994 1	0.815 9	0.185 0	0.180 4	0.877 8

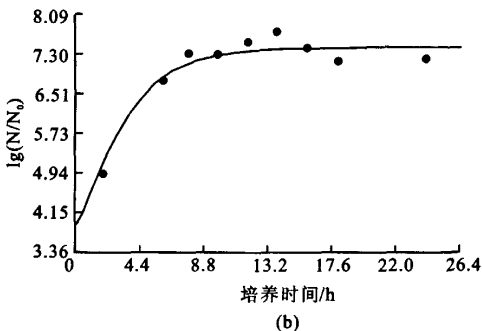
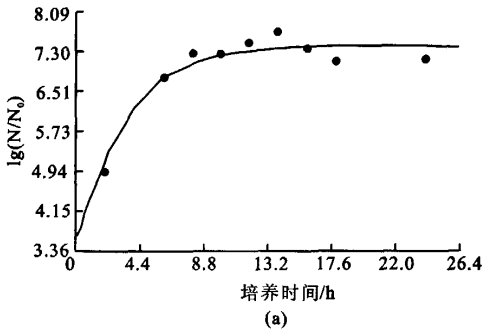


图 1 Gompertz 方程(a)和 Logistic 方程(b)拟合的副溶血弧菌生长曲线(30 °C)

Fig. 1 Growth curves of *V. p* fitted with Gompertz(a) and Logistic(b) models at 30 °C

因此, 根据副溶血性弧菌的生长情况, 将温度

分为 2 个阶段: 第一阶段为 4~10 °C, 由于微生物生长极为缓慢甚至不生长或负增长, 生长曲线不具有 S 形的特点, 宜用 Linear 模型拟合; 第二阶段为 10~40 °C, 选择 Gompertz 和 Logistic 模型拟合生长曲线数据。

2.1.2 二级模型的建立 表 2 给出了用 3 种回归模型计算出的副溶血性弧菌的迟滞期 λ , 最大生长速率 μ_m 以及相对最大细菌浓度 A 。在各种模型的回归中, 在 10~40 °C 时用 Gompertz 模型计算出的最大生长速率 μ_m (以下简称生长速率) 要比 Logistic 方程得出的数值大。因此, 在 10~40 °C 时选取由 Gompertz 模型得到的 μ_m 值建立二级模型, 预测结果更为可靠。由 Linear 方程得到的 μ_m , 除 14、17、20 °C, 其它温度下都是最小的, 这可能是受迟滞期和稳定期的影响所致。

10~40 °C 副溶血性弧菌迟滞期 λ 与培养温度 T 密切相关。14 °C 时迟滞期 λ 长达 39 h, 10~24 °C 时在 4 h 以上, 而 27~30 °C 时, 在 4 h 以下。除了 10 °C 外, 总的来说 λ 随 T 的升高而急剧下降, λ 越长, T 越低。 μ_m 与 T 的关系见图 2, μ_m 随 T 的上升逐渐增大, 达到最适温度后迅速下降, 显示了一个特征的不对称的钟形趋势, 曲线适合用 Ratkowsky3 式数学模型拟合, 回归方程的相关指数 R^2 为 0.929 6, 拟合度较高。

表 2 由 Gompertz, Logistic 和 Linear 方程得到的副溶血性弧菌生长参数

Tab. 2 Values of parameters λ , μ_m and A of *V. p* obtained from the Gompertz, Logistic and Linear regression functions, respectively

培养温度 $T/^\circ\text{C}$	迟滞期 λ/h		剩余均方差 MSE			$\lg A/(\text{cfu}/\text{mL})$	
	Gomp.	Logis.	Gomp.	Logis.	Linear	Gomp.	Logis.
4	—	—	—	—	-0.1117	—	—
7	—	—	—	—	-0.0899	—	—
10	29.787 2	35.366 8	0.098 7	0.071 7	0.052 2	4.643 7	4.542 9
14	39.571 8	43.278 6	0.066 9	0.050 0	0.082 2	8.164 6	7.616 8
17	19.972 1	20.813 2	0.126 6	0.084 0	0.156 6	9.745 4	8.818 0
20	8.642 0	7.940 3	0.215 1	0.112 8	0.247 1	12.012 5	9.878 9
24	4.440 3	4.708 3	0.405 2	0.301 1	0.176 2	7.878 6	7.773 5
27	3.818 3	4.725 1	0.481 7	0.412 4	0.128 7	7.492 4	7.470 8
30	3.867 5	4.798 9	0.481 2	0.410 4	0.125 8	7.418 2	7.397 8
33	4.140 3	4.610 2	0.455 6	0.365 6	0.144 1	7.723 8	7.661 7
37	3.189 2	3.126 2	0.532 6	0.396 2	0.176 1	7.677 5	7.600 7
40	4.137 0	4.988 3	0.455 1	0.401 4	0.146 3	7.493 7	7.458 5

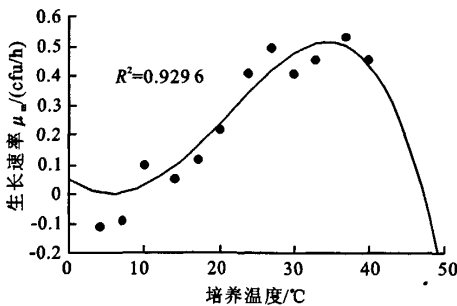


图 2 不同温度下副溶血性弧菌生长速率 μ_m 的试验数据和拟合曲线

Fig. 2 Data of the growth rates of *V. p* modeled by Ratkowsky and the fitting curves

副溶血性弧菌的预测模型和特征参数分别为:

Ratkowsky 模型为 $k = [a_1(T - T_{\min})]^2 \times \{1 - \exp[-a_2(T - T_{\max})]\}$

参数 $a_1 = 0.051$, $a_2 = 0.021$, $T_{\min} = 5.486$, $T_{\max} = 47.264$

由预测模型估计的副溶血性弧菌最低生长温度为 5.5°C , 最高生长温度为 47.3°C , 最适生长温度为 34.6°C 。值得注意的是, 由于微生物在极限条件下的生长速率难以准确测定, 因此, 模型中的最低生长温度可能不是副溶血性弧菌的实际最低生长温度, 在实际测定时, 副溶血性弧菌在 7°C 时已几乎不生长了。最低生长温度与文献资料中的温度基本相符, 最高生长温度略高于文献资料中的温度, 最适生长温度略低于文献资料中的温度^[5],

这可能是由于在 35°C 以上的温度范围所取的实验点太少。

由图 2 可以看出, 副溶血性弧菌的生长曲线适合 Gompertz 模型, 其培养温度 T 与生长速率的关系适合 Ratkowsky3 式, 这两个模型能够比较准确的预测副溶血性弧菌的生长规律, 因此 Ratkowsky 模型能够有效地预测副溶血性弧菌在 $4\sim 40^\circ\text{C}$ 范围内的生长情况, 并为水产品安全性评价提供定量的科学依据, 具有一定指导作用。

2.2 温度模型的验证

对副溶血性弧菌温度模型的可信性在实验室条件下进行了评估, 副溶血性弧菌生长速率平方根的残差 ($\sqrt{\mu_{m, \text{预测}}} - \sqrt{\mu_{m, \text{实测}}}$) 见图 3。

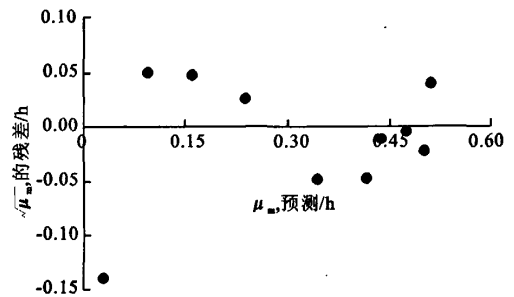


图 3 副溶血性弧菌生长速率平方根的残差分析图

Fig. 3 The residual graphs: the comparison of the growth of *V. p* and prediction model

可以看出, 生长速率平方根的残差几乎都在 ± 0.05 的范围内, 只有 10°C 时例外, 因此可认为预

测模型在 $\alpha=0.05$ 的水平上是可信的。

为了更客观地评价此模型,应用 Ross 引入的偏差因子和准确因子对预测值和实测值进行了分析^[6]。其中,

$$\text{偏差因子} = 10^{\left[\sum \lg(\text{实测生长速率}/\text{预测生长速率})\right]/n}$$

$$\text{准确因子} = 10^{\left[\sum \lg(\text{预测生长速率}/\text{实测生长速率})\right]/n}$$

n 为测定次数,实验中 $n=10$ 。

偏差因子衡量预测值是否过高或过低估计了实测值。该值小于 1 表明生长速率预测值比实测值大,预测值较为安全,而大于 1 意味着预测结果不可靠。一般认为偏差因子在 0.75 到 1.25 之间^[7],模型即可被接受。本模型的偏差因子等于 0.9616,介于这个范围之内。

准确因子衡量预测值与实测值的平均误差,该值等于 1 表明预测值与实测值完全吻合,预测很准

确,但一般在 1.1~1.9 之间均可接受^[8]。本模型的准确因子为 1.0703,说明预测值与实测值的平均误差为 7.03%,预测值较为合理,可以接受。

3 结 语

1) 通过研究 4~40 °C 副溶血性弧菌的生长曲线,结果表明,在 10~40 °C 阶段,副溶血性弧菌的生长曲线呈典型的 S 形,适合用 Gompertz 模型与 Logistic 模型拟合;当温度在 4~10 °C 时,适合用 Linear 模型拟合。

2) 建立了副溶血性弧菌的温度预测模型。根据预测模型,副溶血性弧菌的最低生长温度为 5.5 °C,最高生长温度为 47.3 °C,最适生长温度为 34.6 °C。

3) 验证实验结果表明,模型是充分可信的。

参考文献(References):

- [1] 马光刚,郭福生,王娟,等.海产品中副溶血弧菌的分离与鉴定[J].中国动物检疫,2002,19(9):25-28.
MA Guang-gan, GUO Fu-sheng, WANG Juan, et al. Isolation and identification of *Vibrio parahaemolyticus* in sea products[J]. *Chinese Journal of Animal Quarantine*, 2002, 19(9):25-28. (in Chinese)
- [2] 李敏,李耘,韩北忠,金华火腿中杂色曲霉的生长预测模型[J].食品与发酵工业,2005,31(11):56-59.
LI Min, LI Yun, HAN Bei-zhong. Predictive growth model of *Aspergillus versicolor* in Jinhua Ham[J]. *Food and Fermentation Industries*, 2005, 31(11):56-59. (in Chinese)
- [3] 董明盛,贾英民.食品微生物学[M].北京:中国轻工业出版社,2006:340-342.
- [4] 李博,李里特,辰巳英三,等.豆腐(豆浆)中屎肠球菌生长的温度预测模型[J].中国农业大学学报,2003,8(2):49-54.
LI Bo, LI Li-te, TATSUMI Eizo, et al. Predictive model for effect of temperature on the growth of *E. faecium* in tofu (soymilk)[J]. *Journal of China Agricultural University*, 2003, 8(2):49-54. (in Chinese)
- [5] 孟昭赫.食品卫生检验方法注解[M].北京:人民卫生出版社,1990:172-179.
- [6] Ross T. Indices for performance evaluation of predictive models in food microbiology[J]. *J Appl Bacteriol*, 1996, 81:501-508.
- [7] Giffel M C, Zwietering M H. Validation of predictive models describing the growth of *Listeria monocytogenes*[J]. *Int J Food Microbiol*, 1999, 46:135-149.
- [8] Braun P, Sutherland J P. Predictive modeling of growth and enzyme production and activity by a cocktail of *Pseudomonas spp.*, *Shewanella putrefaciens* and *Acinetobacter sp*[J]. *Int J Food Microbiol*, 2003, 86(9):271-282.

(责任编辑:李春丽)